

## 嘌呤生物合成调控研究

### V. 鼠伤寒沙门氏菌无 *purJ* 的核苷酸序列证据\*

黄 谊 刘 奔 王 敖 全

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

早期的遗传分析表明鼠伤寒沙门氏菌嘌呤核苷酸从头合成途径中 AICAI Transformylase, IMP Cyclohydrolase 和 GAR 合成酶分别由三个结构基因 *purJ*、*purH* 和 *purD* 编码。这三个结构基因构成一个操纵子,定位于遗传图 90 分钟<sup>[1,2]</sup>。但最近对大肠杆菌这一操纵子的核苷酸序列测定及其编码产物的研究,发现在大肠杆菌中为上述三个酶编码的结构基因只有 *purH* 和 *purD*,并不存在 *purJ* 结构基因<sup>[3]</sup>。新近 Chopra 报道了鼠伤寒沙门氏菌位于 *purH* 内的 *EcoRI* 切点下游直至 *purD* 终止密码的核苷酸序列<sup>[4]</sup>,同源性比较分析显示鼠伤寒沙门氏菌这部分序列分别与大肠杆菌的 *purH* 和 *purD* 有 85% 和 88% 的同源性。尽管如此,对鼠伤寒沙门氏菌中究竟有无 *purJ* 结构基因还不能定论,因在鼠伤寒沙门氏菌中至今尚无 *purH* 内 *EcoRI* 切点上游包括 5'端调控区完整序列资料。为澄清这一悬而未决的问题,我们对鼠伤寒沙门氏菌 *purH* 内的 *EcoRI* 切点上游包括 5'端调控区序列和 *EcoRI* 切点下游部分核苷酸序列作了测定。比较了两菌的核苷酸序列并得出结论,认为鼠伤寒沙门氏菌并不存在 *purJ* 结构基因,和大肠杆菌一样,构成这一操纵子的只有 *purH* 和 *purD* 两个结构基因。

#### 1 材料和方法

##### 1.1 材料

1.1.1 菌株: DH5 $\alpha$  supE44  $\Delta$ lacU169 ( $\Phi$ 80lacZ  $\Delta$ M15) hsdR17 recA lendAl gyrA96 thi-1 relAl。

1.1.2 质粒: pLK233, 含 *purH* 和 *purD* 操纵子的 3.3kb 外源片段插在 pUC19 的 Hind III 切点<sup>[5]</sup> pLK212, 含 *EcoRI* 切点上游包括 5'端调控区的 1.2kb 外源片段插在 pUC19 的 Hind III 和 *EcoRI*。

1.1.3 培养基: 丰富培养基用 LB, 大量制备质粒用 plasmid broth<sup>[6]</sup>, 氨苄青霉素终浓度为 50  $\mu$ g/ml。

##### 1.2 方法

质粒提取按文献[7], 核苷酸序列测定用双脱氧末端终止法, 操作步骤按 Pharmacia Bio-Tech 的 T7 Sequencing<sup>TM</sup> Kit 的说明书进行。

#### 2 结果和讨论

##### 2.1 *EcoRI* 切点上游核苷酸序列的测定

酶切分析证明 pLK212 含 *EcoRI* 切点上游约 200bp, 在大肠杆菌中这一片段大小已包括 5'端调控区。测序从 pLK212 为模板, 用正向引物 pUC/M13 测得核苷酸序列示于图 1。

图 1 表明测得的核苷酸序列除 *EcoRI* 切点上游的 *purH* 结构基外还包括有典型的调控区序列, 如 PUR box、-10 区和 S/D 序列。

\* 国家自然科学基金和中国科学院“八五”重点课题资助项目。

本文于 1995 年 12 月 27 日收到。

AATCAATACTCAGGGATAAAAGCGGGGCCAGAATTTAAAAAGAAAAATTC  
 GCGAGCGTTGCGCAAACGTTTTTCGTTACAATGTCGCCGCAAATGAGAAT  
 PUR box -10区  
 ACCCCATAAGGGGCGTTAGCTGAGTTTTTCACGAAAAATTCAGCTAACGC  
 TCTCTGTAATCGTCAAATCCAGGGGATTTCCCATGCAACAACGTCGTCCA  
 S/D  
 GTCCGCCGCGCTCTGCTCAGTGTTTCTGACAAGGCCGGTATCATCGAATTC  
 EcoRI切点

图1 EcoRI 切点上游序列

GAATTCGCCCAGGCACTTTCCGCACGCGGTGTGGAGCTGCTGTCTACGGGG  
 EcoRI切点  
 GGCACCGCCGCGCTGTTAGCAGAAAAAGGCGTCCGGTGACCGAAGTTTCC  
 GATTACACCGGTTTCCCGAAATGATGGATGGACGCGTAAAGACC

图2 EcoRI 切点下游部分核苷酸序列

*Escherichia coli*: ACGGTAACCACACAGTCAAAATTGTGATCACCAT  
*Salmonella typhimurium*: AATCAATACTCAGGGATAAAAGCGGGGCCAGAAT  
 TGAAAGAGAAAAATTCGCGAGCGTTGCGCAAACGTTTTTCGTTACAATTGC  
 TAAAAAGAAAAATTCGCGAGCGTTGCGCAAACGTTTTTCGTTACAATGTC  
 PUR box -10区  
 CGGCGAAAAATAAGGATGCCCCGTTAGGGGCGTTAGCTGAGTTTTTCGCGA  
 GCCGCAAAATGAGAATACCCCATAGGGGCGTTAGCTGAGTTTTTCACGA  
 AAAATTACGTAACGCTCTCTGTAATAGTCAAATCCAGGGGATTTCCCATG  
 AAAATTACGTAACGCTCGCTGTAATCGTCAAATCCAGGGGATTTCCCATG  
 S/D  
 CAACAACGTCGTCCAGTCCGCCGCGCTCTGCTCAGTGTTTCTGACAAAG  
 CAACAACGTCGTCCAGTCCGCCGCGCTCTGCTCAGTGTTTCTGACAAAG  
 purH  
 CCGGTATCGTCAATTCGCCCAGGCACTTTCCGCACGCGGTGTGGAGCTG  
 CCGGTATCATCGAATTCGCCCAGGCACTTTCCGCACGCGGTGTGGAGCTG  
 EcoRI切点  
 CTGTCTACAGGGGGCACTGCCCGTCTGTTAGCAGAAAAAGGTCTGCCGGT  
 CTGTCTACGGGGGGACCGCCCGCTGTTAGCAGAAAAAGGCGTCCGGT  
 AACCGAAGTTTCGATTACACCGGTTTCCGGAGATGATGGATGGACGCGT  
 GACCGAAGTTTCGATTACACCGGTTTCCCGAAATGATGGATGGACGCGT  
 GAAGACC  
 AAAGACC

图3 鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌 pur(J)HD 核苷酸序列比较

## 2.2 EcoRI 切点下游序列的测定

遗传互补试验表明 pLK233 的 3.3kb 外源片段能互补 pur(J)purH 突变并含有一个 EcoRI 切点,为搞清楚 EcoRI 切点下游序列是否与 Chopra 所测得的序列一致,我们以 pLK233 为模板,用正向引物 PUC/M13 测定了 EcoRI 切点下游部分序列,结果示于图 2。

图 2 所示序列与 Chopra 测得的完全一致。

将所测的鼠伤寒沙门氏菌 EcoRI 切点上下游核苷酸序列与大肠杆菌作比较,资料示于图 3。

如图 3 所示: (1) EcoRI 切点前后序列完全一致; (2) EcoRI 切点上游序列的同源性达 85%。由此可得出结论,在鼠伤寒沙门氏菌中也不存在 purJ 结构基因,和大肠杆菌一样构成这一操纵子的只有 purH 和 purD。研究证明大肠杆菌中 purH 编码的多肽具有 AICAR Transformylase 和 IMP Cyclohydrolase 双酶活性中心,因此突变分析可将 purH 分成二类突变体,鼠伤寒沙门氏菌中的 purJ

突变体实际上可能只是 purH 编码的多肽的一个酶活性改变的结果。

## 参 考 文 献

- [1] Gots J. S, Dalal F R, Westby C A. *Bacteriol Proc*, 1969(b), 131~132.
- [2] Gots J S, Berson C E, Jochimsen *et al*. *Ciba Found Symp*, 1977, 48:23~41.
- [3] Flamnigan K A, Hennigan S H, Vogelbacker H *et al*. *Mol Microbiol*, 1990, 4(3):381~392.
- [4] Chopra A K, Peterson J H, Prasad R. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1991, 1090:351~354.
- [5] 李凯奕,戴秀玉,刘奔,等.遗传学报, 1995, 22(2):152~160.
- [6] Stanley R M. Experimental techniques in bacterial genetics. Jone and Bartleu Publishers Inc. 1990. 144.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning——A Laboratory Manual, Secon Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 1.33.

# REGULATION OF PURINE BIOSYNTHETIC GENES EXPRESSION IN *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

## V. NUCLEOTIDE SEQUENCES EVIDENCE WITHOUT purJ GENE

Huang Yi   Liu Ben   Wang Aoquan

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

**Abstract** Previous genetic analysis showed that AICAI transformylase, IMP cyclohydrolase and GAR synthetase are encoded by purJ, purH and purD respectively, and which constitute a operon, mapped on 90 min in genetic map of *Salmonella typhimurium*. But recent study in *E. coli* indicated that the genes encoding for above three enzymes only have purH and purD, without purJ gene. Report here is the DNA sequences evidence for abence of purJ gene in *Salmonella typhimurium*.

**Key words** *Salmonella typhimurium*, purHD operon, purJ